

H5N1 禽流感病毒血凝素抗原快速检测试剂 对不同现场标本的检测比较

陈毅歆¹, 罗海峰¹, 徐飞海¹, 葛胜祥¹, 陈自敏¹, 郭永利¹, 王嘉², 罗文新¹,
吴婷¹, 张军¹, 陈鸿霖^{2,3}, 管轶^{2,3}, 夏宁邵¹

(1. 厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 细胞生物学与肿瘤细胞工程

教育部重点实验室 福建省医学分子病毒学研究中心, 厦门 361005;

2. 汕头大学医学院 汕港联合流感中心, 汕头 515031; 3. 香港大学 微生物系 新发传染病国家重点实验室, 香港)

摘要: 利用 H5 亚型禽流感病毒血凝素抗原快速检测试剂“H5-HA (Ag) Dot-ELISA (H5-Dot)”对来自陆禽、水禽的 484 份气管拭子、泄殖腔拭子和粪便拭子标本进行检测, 结果: 不同采集方式的 H5N1 阳性标本的检出率高低有别, 气管拭子的检出率最高, 泄殖腔拭子次之, 粪便拭子最低 ($P < 0.05$), 因此建议现场采样时应尽可能采集气管拭子标本; 陆禽标本检出率显著高于水禽标本 ($P < 0.05$), 对病毒培养阳性的陆禽气管拭子检出率达 80% (95% CI: 70.6% ~ 87.8%), 对水禽气管拭子标本的检出率为 38% (95% CI: 26.9% ~ 49.4%), 可能与标本中病毒滴度高低有关; 有症状与无症状陆禽标本的检出率无显著差异。另外, H5-Dot 试剂对 333 份非 H5 病毒气管拭子标本的特异性为 99.4% (95% CI: 97.9% ~ 99.9%)。这些结果表明, H5-Dot 是一种较为可靠的 H5 亚型禽流感病毒早期快速检测方法, 在缺乏仪器设施和高素质专业技术人员的 H5N1 禽流感病毒防控第一线具有重要推广价值。

关键词: 禽流感病毒; H5N1; 血凝素; 抗原快速检测; 拭子; 宿主

中图分类号: R373.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721 (2007) 02-0091-05

高致病性 H5N1 禽流感病毒属正粘病毒科甲型流感病毒属, 其基因组由八条单链负义 RNA 片段组成^[1]。甲型流感病毒根据病毒表面糖蛋白血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 的抗原性不同可分为 16 个 H 亚型 (H1 ~ H16) 和 9 个 N 亚型 (N1 ~ N9)^[2]。H5N1 禽流感病毒不仅对陆禽有高致死性, 1997 年还在香港首次引发传人事件, 造成 18 人感染, 6 人死亡^[3,4]。2003 年初, H5N1 禽流感病毒在香港再次引发 2 人感染, 其中 1 人死亡^[5]。2003 年底, H5N1 禽流感疫情在东亚和东南亚地区持续暴发, 2005 至今又逐渐蔓延到俄罗斯、欧洲、中东、非洲和南亚地区, 给世界各国的农业经济和公共卫生带来严重威胁^[6]。据 WHO 官方最新统计 (截止

至 2006 年 7 月 14 日), 已有 10 个国家的 230 人感染 H5N1 禽流感病毒, 其中 132 人死亡^[7]。因此, 监测可疑禽鸟和病人, 在第一时间内发现 H5N1 病毒并采取相应措施控制其扩散传播, 对于 H5N1 疫情的控制具有重要意义。

H5N1 病毒诊断方法包括病毒培养、PCR 检测、免疫学检测和血清学检测等^[8]。这些方法均耗时较长, 无法满足禽流感疫情快速诊断需要, 而且依赖专业的实验室仪器、设备和技术人员, 其使用范围仅局限于大中型专业化实验室。根据目前全世界 H5N1 疫情分布情况, 多数位于经济欠发达地区, 而这些地区通常缺乏早期发现和确诊 H5N1 可疑疫情的实验室条件, 而抗原快速检测试剂具有廉价、方便、快速、无需特殊设备等特点, 可方便上述地区开展早期疫情的现场筛检。根据 2001 ~ 2003 年香港 H5N1 疫情控制经验, Directigen Flu A + B (BD) 抗原快速检测试剂对疫情的早期发现有帮助^[9], 但其缺点是只能测定流感病毒的型别 (即甲、乙、丙或 A、B、C 型), 而不能直接测定病毒的 H 亚型。由于 16 种 H 亚型 A 型流感病毒在禽鸟中均广泛存在^[10], 导致阳性结果过多, 不足以满足广大基层地区高致病性 H5N1 禽流感疫情的早期控制需要。

收稿日期: 2006-07-26; 修回日期: 2006-09-18

基金项目: 国家禽流感防治专项 (2004BA519A73); 福建省科技重点项目 (2005 Y020); 福建省科技重大专项 (2004 YZ01-1); 教育部跨世纪优秀人才培养计划。

作者简介: 陈毅歆 (1977-), 男, 福建东山人, 博士研究生, 研究分子病毒学和免疫学。

通讯作者: 夏宁邵 (1964-), 男, 湖南娄底人, 博士生导师, 研究分子病毒学。Tel: 86-592-2184110; Fax: 86-592-2181258 (E-mail: nsxia@xmu.edu.cn)

本实验室葛胜祥等^[11]已报道基于广谱性抗 H5 亚型血凝素单抗和酶联免疫渗滤技术,研制出一种能够直接鉴定亚型的 H5 亚型禽流感病毒血凝素抗原快速检测试剂 H5-Dot。为了分析该试剂在现场检测中的有效性,本研究利用采集自陆禽和水禽的 484 份 H5N1 病毒培养阳性的气管拭子、泄殖腔拭子和粪便拭子标本及 333 份非 H5 亚型拭子标本分析 H5-Dot 试剂对不同类现场标本的检出情况,为该试剂的推广应用和早期诊断方案的制订提供科学依据。

材料与方法

1 病毒标本的采集、保藏与鉴定 气管拭子、泄殖腔拭子和粪便拭子标本均为香港大学分离保藏,标本来源及背景介绍参见文献^[12],分别来自 2001 ~ 2003 年香港 H5N1 禽流感疫情暴发期间的病禽或无症状禽,华南地区活禽市场中的无症状禽,华南地区越冬候鸟。病毒标本用棉拭子采集后,先浸入病毒输送液(Viral transport media,VTM)暂时保藏于 4℃ 条件下,运抵实验室后再转移入-70℃ 冰箱永久保藏。病毒标本的鉴定采用鸡胚培养法定性,并用不同亚型的甲型流感病毒标准抗血清鉴定分型^[13]。本研究所用标本包括 484 份 H5 亚型病毒标本和 333 份非 H5 亚型病毒标本。

2 H5-HA(Ag) Dot-ELISA 的检测 取出病毒拭子标本浸出液融化后,根据试剂盒说明书进行检测。标本预处理:取 200 μl 待测拭子标本浸出液加入样品处理装置中,滴入 14 滴裂解液并充分混匀;加样:将上述预处理样品全部滴入样品检测区,待样品完全渗滤干净后;加入酶标抗体:在检测区继续滴入 4 滴标记 HRP 的酶标抗体试剂,待完全渗

滤干净后静置 2 min;洗涤:用洗涤液洗涤 3 遍;显色读数:待所有液体渗滤干净后,滴入 2 滴显色液显色 3 min 后判定结果。整个检测周期约 30 ~ 40 min。

3 统计学分析 采用二项式法计算各指标灵敏度和特异度的 95 % 可信区间(95 % CI),采用多层卡方检验(Chi-square (χ^2) test)和 Fisher's 精确检验分析各指标间的灵敏度差别,所有计算均用 SPSS 软件完成(Version 11.0, SPSS Inc.)。

结 果

1 H5-HA(Ag) Dot-ELISA 对来自不同宿主、不同采样方式的 H5N1 病毒阳性现场标本的检测

用 H5-Dot 试剂检测经病毒培养确证为 H5N1 病毒阳性的病禽或无症状禽的现场标本(表 1),结果:有症状和无症状陆禽的检出率没有统计学差异,其中无症状陆禽的气管拭子标本和泄殖腔拭子标本的检出率分别为 88 % 和 86 %,而有症状陆禽的气管拭子标本检出率为 80 %;陆禽检出率显著高于水禽($M-H\ Te/Aq = 19.78, P < 0.01$),陆禽和水禽气管拭子检出率分别为 80 % (95 % CI: 70.6 % ~ 87.7 %) 和 38 % (95 % CI: 26.9 % ~ 49.4 %),而陆禽和水禽泄殖腔拭子检出率分别为 64 % (95 % CI: 35.1 % ~ 87.2 %) 和 18 % (95 % CI: 11.8 % ~ 25.1 %);不同采集方式的阳性标本存在灵敏度差别,气管拭子标本检出率最高,其次是泄殖腔拭子标本,粪便标本检出率最低,差别均有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 H5-HA(Ag) Dot-ELISA 试剂对来自不同宿主的三种不同类型的 H5N1 禽流感病毒现场标本的检测

Table 1 Detection of three kinds of avian H5N1 positive field samples from different hosts with H5-HA(Ag) Dot-ELISA

Host type	Host status	Results	Trachea swab	Cloacae swab	Fecal swab
Terrestrial	Diseased	Positive	66	3	
		Negative	17	4	
		Sensitivity (95 % CI)	80 % (69.2-87.6)	43 % (10.0-81.6)	
	Asymptomatic	Positive	7	6	
		Negative	1	1	
		Sensitivity (95 % CI)	88 % (47.4-99.7)	86 % (42.1-99.6)	
	Total	Sensitivity (95 % CI)	80 % (70.6-87.8)	64 % (35.1-87.2)	
	Asymptomatic				
Aquatic	Asymptomatic	Positive	29	25	11
		Negative	48	116	150
		Sensitivity	38 %	18 %	7 %
		(95 % CI)	(26.9-49.4)	(11.8-25.1)	(3.5-11.9)

2 H5- HA(Ag) Dot- ELISA 试剂对非 H5 亚型病毒气管拭子的特异性

用 H5-Dot 检测 333 份非 H5 亚型病毒气管拭子标本(表 2),结果仅 2 份阳性,特异性为 99.4 %。

表 2 H5- HA(Ag) Dot- ELISA 检测非 H5 气管拭子现场标本的特异性

Table 2 Specificity of H5- HA(Ag) Dot- ELISA determined with non- H5 trachea swab samples

Virus *	Positive/ No. tested	Specificity (95 %CI)
H1	2/ 111	98.2 %
H3	0/ 110	100 %
H4	0/ 6	100 %
H6	0/ 15	100 %
H7	0/ 1	100 %
H8	0/ 1	100 %
H9	0/ 53	100 %
H11	0/ 5	100 %
H12	0/ 1	100 %
NDV	0/ 30	100 %
Total	2/ 333	99.4 % (97.9 %~99.9 %)

*. H1,3,4,6,9,11,12. Flu A subtype; NDV. Newcastle disease virus.

讨 论

本实验室自主开发的 H5 亚型禽流感病毒血凝素抗原快速检测试剂 H5-Dot 具有良好的特异性和灵敏度,对当前亚洲地区流行的各种遗传变异亚系的 H5N1 病毒培养液均能检出,检测灵敏度为 0.01 ~ 1 HA 滴度,对非 H5 亚型禽流感标准病毒株的特异性为 100 %^[11]。本研究利用 817 份 H5 或非 H5 亚型现场标本分析该试剂对各类禽流感现场标本的检测性能,为该试剂的推广应用提供科学依据。研究中使用的无症状陆禽 H5N1 阳性标本数量较少(表 1),主要与当前 H5N1 禽流感疫苗的大规模接种,使得家鸡等陆禽发病率大为降低而影响了病毒分离率有关;而且 H5N1 对陆禽有高致病性,陆禽感染 H5N1 病毒发病后很快死亡,在活禽零售市场较难分离到无症状陆禽 H5N1 阳性标本。

对于不同宿主类型标本,陆禽标本检出率显著高于水禽标本,提示陆禽标本中病毒含量明显高于水禽中病毒含量,这可能与禽流感病毒在其天然宿主——水禽内复制效率较低而携带病毒含量较低有关。有研究证实,家鸭等家养水禽具有较强的耐受高致病性 H5N1 禽流感病毒的能力,病毒可在其体内长时期低效率复制^[14]。对于陆禽标本,有症状陆

禽与无症状陆禽的检出率没有明显差别,前者主要来自家鸡,后者的宿主来源包括鹌鹑、银丝鸡、山鹑、雉鸡、珍珠鸡、鸽子等陆上野禽,提示 H5N1 病毒在家鸡和其他种类的陆禽体内的复制能力可能有区别而导致发病症状不同,家鸡可能比其他陆地野禽对 H5N1 病毒更敏感,更容易出现症状。

对于气管拭子、泄殖腔拭子和粪便拭子等三种不同采集方式采集的现场标本的检出率有明显差别。陆禽(包括发病陆禽和无症状陆禽)气管拭子标本的检出率最高(平均为 80 %,95 %CI:70.6 % ~ 87.8 %),泄殖腔拭子标本的检出率较低(平均为 64 %,95 %CI:35.1 % ~ 87.2 %),前者检出率显著高于后者;而水禽气管拭子标本的检出率也比泄殖腔拭子标本高,前者为 38 % (95 %CI:26.9 % ~ 49.4 %),后者为 18 % (95 %CI:11.8 % ~ 25.1 %)。提示气管拭子标本中病毒含量高于泄殖腔拭子标本中病毒含量,而气管拭子标本采自下呼吸道,这和最近研究发现的 H5N1 禽流感病毒感染人类的主要受体细胞位于人类下呼吸道有一定的相关性^[15,16],提示病毒在禽鸟的下呼吸道可能也具有较高的复制效率,带毒量较高。研究结果显示该试剂对粪便标本中的 H5N1 病毒检出率明显偏低,可能与粪便中病毒含量较低有关,也可能与粪便中各种复杂组分的影响有关。因此,应用该试剂进行现场检测时,若能优先采集气管拭子标本,将有助于提高整体检测灵敏度,减少不必要的漏检。

另外,该快速检测试剂对 333 份非 H5 亚型病毒气管拭子标本进行检测显示出优异的特异性。值得注意的是,仅有的 2 份假阳性标本均为 H1 亚型,可能与 H5、H1 两种 H 亚型的 HA 基因在遗传进化上关系较为亲近有关^[17],但此试剂对 111 份 H1 亚型标本仅出现 2 份假阳性,特异性为 98.2 % (95 %CI:93.6 % ~ 99.8 %),对余下的 222 份 H3、H4、H6、H7、H8、H9、H11、H12 和 NDV 病毒则具有 100 %特异性,这足以去除对此试剂特异性的不必要担忧。

H5-Dot 试剂利用自主研发的 H5 特异性广谱单抗^[18]对 H5 亚型病毒做直接测定,解决了目前商业化甲型流感病毒快速抗原检测试剂不能在第一时间判断是否 H5 亚型流感病毒的缺陷。但流感病毒基因(尤其是 HA 基因)的高度变异性,使 H5 亚型禽流感快速抗原检测试剂对抗 H5 亚型血凝素单抗的广谱识别性和特异性等要求极高,提示加强对病毒抗原变异的监控,及时发现单抗反应谱的变化,并

据此及时更新该试剂所使用的单抗是十分必要的。

总之,本文研究数据表明 H5-Dot 试剂是一种有效的 H5 亚型禽流感病毒抗原快速检测试剂,无需任何专用设备即可在 30 ~ 40 min 内得出检测结果。其灵敏度、特异度及方便性完全可以满足现场标本初步诊断的需要,尤其适合缺乏仪器设施和高素质专业技术人员的基层单位对禽流感疫情防控的需要,有助于提高防控第一线对 H5N1 禽流感疫情的检测效率和快速应对能力。但疫情的最终确诊仍离不开传统的病毒分离确证手段。可以预见, H5-Dot 试剂将对 H5N1 禽流感疫情进行现场早期筛查发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Webster R G, Bean W J, Gorman O T, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses[J]. Microbiol Rev, 1992, 56:152-179.
- [2] Fouchier R A, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls[J]. J Virol, 2005, 79:2814-2822.
- [3] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness[J]. Science, 1998, 279:393-396.
- [4] Claas E C, Osterhaus A D, van Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus[J]. Lancet, 1998, 351:472-477.
- [5] Peiris J S, Yu W C, Leung C W, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease[J]. Lancet, 2004, 363:617-619.
- [6] World Health Organization. H5N1 avian influenza: timeline[DB]. 2006 May 8 [Cited 2006 Jul 20]. Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/timeline.pdf.
- [7] World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/ (H5N1) reported to WHO[DB]. 2006 July 14 [Cited 2006 Jul 20]. Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_07_14/en/index.html.
- [8] Beigel J H, Farrar J, Han A M, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans[J]. N Engl J Med, 2005, 353:1374-1385.
- [9] Chan K H, Maldeis N, Pope W, et al. Evaluation of the Directigen FluA + B test for rapid diagnosis of influenza virus type A and B infections [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40:1675-1680.
- [10] Webster R G, Peiris M, Chen H, et al. H5N1 outbreaks and enzootic influenza [J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12:3-8.
- [11] 葛胜祥,徐飞海,罗海峰,等. 一种新型 H5N1 禽流感病毒血凝素抗原快速检测试剂的建立[J]. 病毒学报, 2006, 22:444-448.
- [12] Chen H, Smith G J, Li K S, et al. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103:2845-2850.
- [13] Guan Y, Shortridge K F, Krauss S, et al. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China [J]. J Virol, 2000, 74:9372-9380.
- [14] Hulse-Post D J, Sturner Ramirez K M, Humberd J, et al. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102:10682-10687.
- [15] Van Riel D, Munster V J, De Wit E, et al. H5N1 virus attachment to lower respiratory tract[J]. Science, 2006, 312:399.
- [16] Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway[J]. Nature, 2006, 440:435-436.
- [17] Kawaoka Y, Yamnikova S, Chambers T M, et al. Molecular characterization of a new hemagglutinin, subtype H14, of influenza A virus[J]. Virology, 1990, 179:759-767.
- [18] 陈毅歆,罗海峰,葛胜祥,等. 高致病性 H5 亚型禽流感行感冒病毒血凝素单克隆抗体的制备与初步应用[J]. 病毒学报, 2005, 21:422-427.

Evaluation of H5- HA (Ag) Dot- ELISA for Detection of H5N1 Virus in Field Samples

CHEN Yi-xin¹, LUO Hai-feng¹, XU Fei-hai¹, GE Sheng-xiang¹, CHEN Zi-min¹,
GUO Yong-li¹, WANG Jia², LUO Wen-xin¹, WU Ting¹, ZHANG Jun¹,
CHEN Hong-lin^{2,3}, GUAN Yi^{2,3}, XIA Ning-shao¹

- (1. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development of Infectious Diseases, The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Xiamen University, Research Center of Medical Molecular Virology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Joint Influenza Research Center (SUMC & HKU), Medical College of Shantou University, Shantou 515031, China;
3. State Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Department of Microbiology, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong SAR, China)

Abstract : Detection of 484 H5N1 positive field samples (trachea swabs, cloacae swabs and fecal swabs) obtained from terrestrial and aquatic poultry using a rapid antigen detection test, H5- HA (Ag) Dot- ELISA (H5-Dot), for direct and rapid detection of hemagglutinin antigen (Ag) of H5 subtype avian influenza virus was carried out. By using H5-Dot, it was shown that: The sensitivity was different in detecting field samples with varied sample sources, where trachea swab was higher than cloacae swab, and fecal swab was the lowest ($P < 0.05$), which might be associated with variation of virus excretion titers. So, trachea swab is the best sample for detection of field H5 avian influenza virus by using this method; The sensitivity for H5-positive swab samples from terrestrial poultry was significantly higher than that from aquatic poultry ($P < 0.05$), which was 80 % (95 %CI: 70.6 % - 87.8 %) and 38 % (95 %CI: 26.9 % - 49.4 %) for trachea swabs respectively; Sensitivity had no difference in detecting swab samples from diseased or asymptomatic terrestrial poultry. It also showed the nice specificity of 99.4 % (95 %CI: 97.9 % - 99.9 %) for 333 non- H5 trachea swab samples. These results suggest that H5-Dot is an acceptable detection test for routine screening of H5N1 infection in the fields.

Key words : avian influenza virus; H5N1; HA; rapid antigen detection; swab; host

Corresponding author: XIA Ning-shao, Tel: 86-592-2184110; Fax: 86-592-2181258; E-mail: nsxia@xmu.edu.cn